



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Υπερέκφραση του γονιδίου *LjGSK3β-1* του *Lotus japonicus*,  
που κωδικοποιεί για μια κινάση με ρόλο στη συμβίωση  
ψυχανθών-ριζόβιων

Overexpression of the *LjGSK3β-1* gene in *Lotus japonicus*,  
encoding a kinase with a role in legume-rhizobium  
symbiosis



Διπλωματική εργασία  
**Μήττα Ελένη**  
Λάρισα 2014

## Τριμελής εξεταστική επιτροπή

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επιβλέπουσα  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Λεωνίδας Δημήτριος, Μέλος  
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Λιαδάκη Καλλιόπη, Μέλος  
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Εικόνα εξωφύλλου:** απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της κινάσης GSK3b στον άνθρωπο.

## **Ευχαριστίες**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας που πέραν από την εμπιστοσύνη που μου έδωσε κατά την εκτέλεση της διπλωματικής εργασίας μου, αποτέλεσε σημαντική επιρροή στην διαμόρφωση των επιστημονικών μου ενδιαφερόντων.

Επίσης ευχαριστώ πολύ όλους όσους βρίσκονται στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και ιδιαίτερα την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ψαρράκου Ιωάννα-Σοφία, για την στήριξη, την υπομονή και την κατανόηση που μου έδωσε μέσα στο εργαστήριο.

Τέλος οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ σε όλους τους φίλους, μου που μαζί μέσα από άγχη, στενοχώριες και χαρές περάσαμε τα φοιτητικά μας χρόνια ο ένας στο πλευρό του άλλου.

## Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	6
Εισαγωγή	7
Glycogen synthase kinase 3 (GSK3)	7
Βρασσινοστεροειδή	7
GSK3b στα θηλαστικά	7
<i>Arabidopsis</i> SHAGGY-like πρωτεϊνικές κινάσες (ASK)	8
Κινάσες του <i>Lotus japonicus</i>	10
Συμβίωση ψυχανθών-ριζόβιων	10
Έναρξη της συμβίωσης και σχηματισμός του φυματίου	11
Σηματοδότηση για εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης	12
Υλικά και μέθοδοι	15
Βακτηριακά στελέχη	15
Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA	16
Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα	16
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i>	16
Υπολογισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων	17
Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης	17
Απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας από πηκτή αγαρόζης	18
Αντίδραση ενοποίησης τμημάτων DNA	18
Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	19
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	20
Δημιουργία βακτηριακής καλλιέργειας για την επαγωγή έκφρασης του γονιδίου <i>LjGSK3β</i>	22
Λύση κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	22
Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης	22
Καθαρισμός της πρωτεΐνης	23
Θρεπτικά υλικά και διαλύματα	24
Σκοπός του πειράματος	27
Πειραματικά αποτελέσματα	28
Πλασμιδιακοί φορείς	28
Προετοιμασία βακτηριακών κυττάρων	28

Επαγωγή γονιδίων_____	29
Επαγωγή του γονιδίου και καθαρισμός της πρωτεΐνης _____	32
Συζήτηση _____	34
Παράρτημα_____	36
Βιβλιογραφία _____	38

## Περίληψη

---

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθεί σχεδιάστηκε για να επιτευχθεί η υπερέκφραση του γονιδίου *LjGSK3β* σε βακτηριακά κύτταρα, έτσι ώστε να απομονωθεί η καθαρή πρωτεΐνη σε μεγάλη ποσότητα και να ακολουθήσει ο προσδιορισμός της ακριβούς δομής της με την βοήθεια της κρυσταλλογραφίας. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν εκφράσεις του ζητούμενου γονιδίου σε μικρό όγκο καλλιέργειών υπό την επίδραση διαφορετικών συνθηκών θερμοκρασίας, συγκέντρωσης επαγωγέα και χρόνου επαγωγής. Σε αυτές τις εκφράσεις παρατηρήθηκε η δυνατότητα απομόνωσης της πρωτεΐνης GSK3β. Τα αποτελέσματα αυτών των εκφράσεων μας οδήγησαν στην επιλογή των βέλτιστων συνθηκών για να προβούμε στην έκφραση του *LjGSK3β* σε καλλιέργειες μεγάλου όγκου και την απομόνωση μεγάλης ποσότητας της GSK3β.

## Abstract

---

The experimental procedure followed was designed to achieve overexpression of the *LjGSK3β* gene in bacterial cells, in order to isolate the purified protein-product of this gene in large quantity and to proceed with the identification of the exact structure by means of crystallography. Initially, expressions of the desired gene were performed in a small volume of bacterial culture under the influence of various conditions of temperature, time and concentration of inducer induction. In these expressions observed the possibility of isolating the protein GSK3β. The results of these expressions have led us to select the best conditions to carry out the expression of *LjGSK3β* gene, in large volume bacterial cultures and thus succeed a massive isolation of GSK3β protein.

# Εισαγωγή

---

## Glycogen synthase kinase 3 (GSK3)

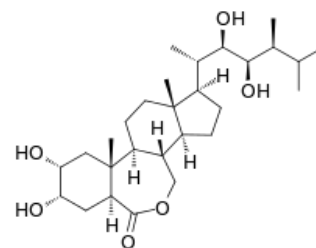
---

Η GSK3 (glycogen synthase kinase 3) αρχικά ανακαλύφθηκε ως μια κινάση που φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την συνθάση γλυκογόνου. Είναι πλέον γνωστό ότι είναι μια καλά διατηρημένη κινάση σερίνης/θρεονίνης, που εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες ελέγχοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, την δυναμική του κυτταροσκελετού και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Frame and Cohen, 2001). Στα θηλαστικά υπάρχουν μόνο δύο ισομορφές της GSK3, η GSK3a και η GSK3b. Σε αντίθεση με αυτό, πολλά είδη φυτών φαίνεται να είναι “εξοπλισμένα” με περισσότερες GSK3-like κινάσες (Richard *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2006). Μια από αυτές τις κινάσες στο *Arabidopsis thaliana* είναι και η BIN2 (Jonak and Hirt, 2002), η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της σηματοδότησης των βρασσινοστεροειδών.

## Βρασσινοστεροειδή

---

Τα βρασσινοστεροειδή (Brassinosteroids, BR) είναι πολύ-υδροξυστεροειδείς ενώσεις που υπάρχουν στα φυτά (Εικόνα 1). Αυτή η ομάδα ορμονών παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών ρυθμίζοντας την επιμήκυνση και την διαίρεση του κυττάρου σε βλαστούς και ρίζες καθώς και τη φωτομορφογένεση, την αναπαραγωγική ανάπτυξη, τη γήρανση του φύλλου και τις αποκρίσεις σε καταπονήσεις (Clouse and Sasse 1998). Αν και δεν έχουν άμεση επίδραση στον σχηματισμό φυματίων, τα βρασσινοστεροειδή εμπλέκονται σε έναν βλαστικό μηχανισμό που ελέγχει τον αριθμό των φυματίων (Brett J. Ferguson *et al.*, 2005).



**Εικόνα 1:** Χημική δομή βρασσινοστεροειδών

## GSK3b στα θηλαστικά

---

Η GSK3 εκφράζεται ευρέως στα θηλαστικά και εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον Wnts, Hedgehog, Notch και από αυξητικούς παράγοντες όπως η ινσουλίνη και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας. Η δράση της αυτή είναι σημαντική για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, καθώς και την επιβίωση και

την απόπτωση τους. Τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν δυο ισομορφές (GSK3a και GSK3b), που έχουν σχεδόν ταυτόσημες καταλυτικές περιοχές. Και οι δυο ισομορφές ενεργοποιούνται από την φωσφορυλίωση μιας τυροσίνης (Tyr279 στην GSK3a και Tyr216 στην GSK3b) και αναστέλλονται με φωσφορυλίωση σερίνης/θρεονίνης (Ser21 στην GSK3a και Ser9 και Thr390 στην GSK3a) (Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR, 2011). Ακόμη ανάλογα με το μονοπάτι στο οποίο χρησιμοποιείται, η GSK3 μπορεί ακόμα να ρυθμιστεί με την διαμερισματοποίηση της ή με τη δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων (Bijur GN, Jope RS, 2003).

Αρκετές μελέτες έχουν τονίσει την σημαντικότητα της GSK3 στην επιβίωση ή/και απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Η έκφραση της GSK3b ισομορφής αυξάνεται σε πολλούς διαφορετικούς καρκινικούς τύπους, όπως είναι το μύελωμα (Zhou Y, Uddin S *et al.*, 2008), ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (Naito S *et al.*, 2010), το γλοιοβλάστωμα (Miyashita K *et al.*, 2009, Mamaghani S, Patel S, Hedley DW, 2009), ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Shakoori A *et al.*, 2005), ο καρκίνος του παγκρέατος (Ougolkon AV *et al.*, 2006, Shakoori A *et al.*, 2005, Mamaghani S, Patel S, Hedley DW, 2009), ο καρκίνος των ωοθηκών (Miyashita K, 2009, Cao Q, Feng YJ, 2006), ο καρκίνος νεφρού (Bilim V *et al.*, 2009) και στον προστάτη (R. Siobhan Darrington *et al.*, 2012). Έχει αρχίσει ήδη να ερευνάτε η χρήση παρεμποδιστών της GSK3b για την καταπολέμηση του καρκίνου. Ένας τέτοιος παρεμποδιστής είναι το τριτερπένιο λουπεόλη (Mohammad Saleem *et al.*, 2009).

### Arabidopsis SHAGGY-like πρωτεϊνικές κινάσες (ASK)

Στο φυτό *Arabidopsis thaliana* έχουν αναγνωριστεί δέκα GSK3-like κινάσες, γνωστές ως ASKs (Arabidopsis SHAGGY-like protein kinases) που μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις υποομάδες με την βοήθεια φυλογενετικών αναλύσεων (Jonak and Hirt, 2002) (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** Φυλογενετική ανάλυση των GSK3-like κινάσων στον οργανισμό *Arabidopsis thaliana*



Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των μελών αυτής της πρωτεϊνικής οικογένειας είναι υψηλά συντηρημένες στην περιοχή της κινάσης. Στην περιοχή της T-θηλιάς όλες οι GSK έχουν ένα κατάλοιπο τυροσίνης που είναι ισοδύναμο με την φωσφορυλιωμένη Tyr216 των GSK3 που βρίσκονται στα θηλαστικά. Άλλα αμινοξέα των GSK3 των θηλαστικών που παρουσιάζουν αντίστοιχα ισοδύναμα στις GSK των φυτών είναι η Arg94, η Arg180 και η Lys205. Σε αντίθεση με τις παραπάνω συντηρημένες περιοχές, οι αμινοτελικές και οι καρβοξυτελικές περιοχές των φυτικών GSK διαφέρουν εμφανώς. Με αυτή την παρατήρηση οδηγούμαστε στην υπόθεση ότι η ποικιλίες GSK των φυτών εμπλέκονται σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες όπως είναι η απάντηση του φυτού σε μια κατάσταση στρες, η ανάπτυξη και η σηματοδότηση μέσω ορμονών (Jonak and Hirt, 2002).

Η εμπλοκή των GSK σε καταστάσεις στρες φαίνεται για παράδειγμα στο φυτό *M.sativa*, όπου μετά από τον τραυματισμό του ενεργοποιείται μια GSK-3, η κινάση WIG. Σε υγιή φύλλα, η ενεργότητα της κινάσης WIG είναι χαμηλή και αυξάνεται σε περίπτωση τραυματισμού (Jonak *et al.*, 2000).

Μερικές GSK του *A. thaliana*, όπως είναι η ASKα, η ASKγ, η ASKζ και η ASKη, εμπλέκονται στην ανάπτυξη του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, οι πρώτες δυο κινάσες φαίνεται ότι ρυθμίζουν το μοτίβο των άνθεων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (Dornelas, M.C. *et al.*, 2000), ενώ η ASKζ και η ASKη εκφράζονται κατά την εμβρυακή ανάπτυξη (Dornelas, M.C. *et al.*, 1999).

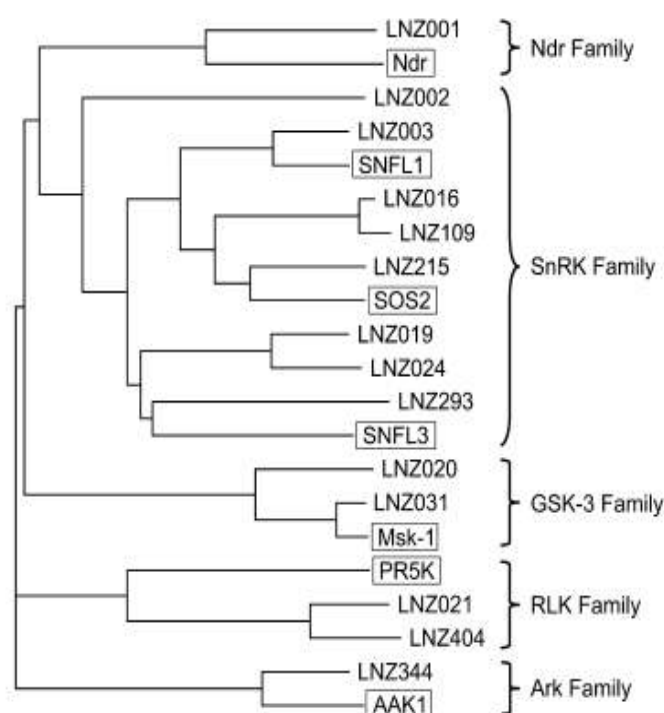
Φαινοτυπικές και μοριακές αναλύσεις υποδεικνύουν έναν ρυθμιστικό ρόλο της ASKθ (η αλληλουχία παρατίθεται στο παράρτημα) στην ορμονική σηματοδότηση των βρασσινοστεροειδών. Βιοχημικά δεδομένα δείχνουν ότι η δράση της ASKθ ρυθμίζεται αρνητικά από τον BRI1 και ότι η ASKθ φωσφορυλιώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες BES1, BZR1 και BEH2, που είναι ένας BES/BZR-like μεταγραφικός παράγοντας (Wilfried Rozhon *et al.*, 2010). Λόγω λοιπόν αυτής της εμπλοκής της ASKθ με τους συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες, καταλαβαίνουμε ότι η δραστηριότητα της κινάσης αυτής είναι καθοριστική για την ανάπτυξη φαινότυπου-νάνου στα φυτά.

Έχει αποδειχθεί ότι η ASKθ ελέγχεται αρνητικά από τα βρασσινοστεροειδή (ποσότητα BR και δημιουργία συμπλόκου με τον BRI1). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν και επεκτείνουν τον ρόλο των GSK στην σηματοδότηση μέσω BR, καθώς προσδιορίζουν την ASKθ ως ένα καινούριο σημείο ελέγχου (Wilfried Rozhon *et al.*, 2010). Έτσι η δράση της ASKθ προστίθεται στις δράσεις των υπόλοιπων GSK3/SHAGGY-like κινάσων (BIN2, ASKι και ASKζ) (Claisse *et al.*, 2007). Οι κινάσες ASKθ, BIN2, ASKι και ASKζ παρότι έχουν πολλές ομοιότητες, παρουσιάζουν διαφορετικές ειδικότητες πρόσδεσης προς διαφορετικά μέλη της οικογένειας των BES1/BZR1-like μεταγραφικών παραγόντων (Wilfried Rozhon *et al.*, 2010).

## Κινάσες του *Lotus japonicus*

Στον οργανισμό *L. japonicus* έχουν βρεθεί κάποιοι γενετικοί τόποι που κωδικοποιούν κινάσες. Με την χρήση των αλληλουχιών αυτών οι κινάσες αυτές κατατάχθηκαν σε πέντε οικογένειες και βρέθηκαν κινάσες που είναι ομόλογες και σε άλλους φυτικούς οργανισμούς (Εικόνα 3) (Kameshita I. *et al.*, 2005).

Τα γονίδια αυτά έχουν απομονωθεί εργαστηριακά και έχουν αλληλουχιθεί (η αλληλουχία του *LjGSK3β* παρατίθεται στο παράρτημα). Μπορεί οι έρευνες όσον αφορά τις κινάσες να είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο, όμως έχει βρεθεί η έκφραση τους σε περιοχές της ρίζας που σχηματίζονται φυμάτια (Kameshita I. *et al.*, 2005).



**Εικόνα 3:** Φυλογενετική ανάλυση των κινασών Ser/Thr στο *L. japonicus*. Στο φυλογενετικό δένδρο φαίνεται η συγγένεια μεταξύ των κινασών βασιζόμενη σε αμινοξικές αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε περιοχές cDNA κλώνων. Ακόμη φαίνονται κινάσες άλλων φυτών που εμφανίζουν στενή συγγένεια (βρίσκονται μέσα σε πλαίσιο), οι συγγενικές κινάσες στα άλλα φυτά είναι: η Ndr κινάση του *Arabidopsis thaliana*, η SNFL1 πρωτεϊνική κινάση του *Sorghum bicolor*, η SOS2 πρωτεΐνη του *Arabidopsis thaliana*, η SNFL3 που είναι μια πιθανή κινάση Ser/Thr του *Sorghum bicolor*, η Msk-1 που αποτελεί μία GSK-3 like κινάση του *Medicago sativa*, η PR5K εμφανίζει συγγένεια με τον PR5K υποδοχέα της κινάσης Ser/Thr του *Arabidopsis thaliana*, η AAK1 του *Oryza sativa*. Τέλος δεξιά του δένδρου αναγράφονται οι οικογένειες στις οποίες έχουν κατηγοριοποιηθεί οι κινάσες αυτές.

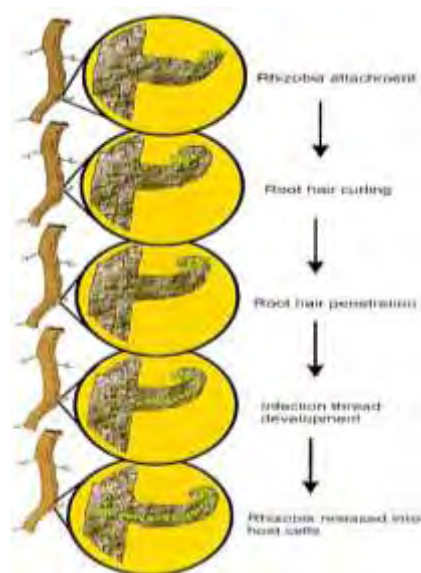
## Συμβίωση ψυχανθών-ριζόβιων

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους, τα φυτά έχουν εφεύρει διάφορες λύσεις για το πρόβλημα της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στη γη. Μια από τις λύσεις

ήταν η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων. Η συμβίωση φυτού-μύκητα πριν από 450 εκατομμύρια χρόνια ίσως ήταν μια εξέλιξη καθοριστική που κατέστησε τα φυτά ικανά να αποικήσουν τη γη (Pirozynski & Malloch, 1975; Remy *et al.*, 1994).

Μία διαφορετικού είδους αλληλεπίδραση φυτού-μικροβίου που εφοδιάζει ένα περιορισμένο εύρος φυτών με το συχνά ελλειπές μακροστοιχείο άζωτο είναι η συμβιωτική αζωτοδέσμευση (SNF: symbiotic nitrogen fixation). Αυτού του τύπου η συμβίωση εξελίχθηκε πιο πρόσφατα, περίπου 60 εκατομμύρια χρόνια πριν, και περιορίζεται σε ψυχανθή και σε ελάχιστα μη-ψυχανθή είδη φυτών (Doyle, 1998) τα οποία συμβιώνουν με ριζόβια ή άλλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, αντίστοιχα (Pawlowski & Bisseling, 1996). Πρόκειται για μια πολύ ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού ξενιστή και του βακτηριακού στελέχους, όπου βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* και *Sinorhizobium* προκαλούν το σχηματισμό του φυματίου στο αντίστοιχο φυτό ξενιστή. Το φυτό παρέχει στον ενδοσυμβιώτη του φωτοσυνθετικά προϊόντα, με αντάλλαγμα άζωτο σε μορφή αμμωνιακών ιόντων και αμινοξέων (Udvardi & Day, 1997).

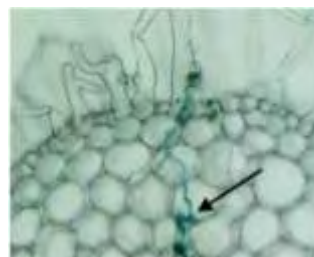
#### Έναρξη της συμβίωσης και σχηματισμός του φυματίου



**Εικόνα 4:** Έναρξη σχηματισμού του φυματίου

Η περιοχή της ρίζας που είναι δεκτική στη μόλυνση από τα ριζόβια είναι αυτή των νεοαναπτυσσόμενων ριζικών τριχιδίων. Η πρώτη αντίδραση των ριζικών τριχιδίων στην παρουσία των ριζοβίων είναι η παραμόρφωσή τους. Μόλις τα βακτήρια έρθουν σε επαφή με το άκρο των ριζικών τριχιδίων του φυτού, δημιουργείται κύρτωση στο άκρο του τριχιδίου και τα βακτήρια που βρίσκονται προσκολλημένα στο τριχίδιο παγιδεύονται μέσα σ' αυτή (Εικόνα 4). Εκείνη τη στιγμή συμβαίνουν πολλές μορφολογικές αλλαγές στο φυτικό κύτταρο, όπως αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης (Ehrhardt *et al.*, 1992), αυξημένη ροή ασβεστίου, έκκριση πρωτονίων, αναδιοργάνωση των νηματίων ακτίνης (Allen *et al.*, 1994) και αναδιάταξη του κυτταροπλάσματος (Heidstra *et al.*, 1994). Στο σημείο επαφής το κυτταρικό τοίχωμα υδrolύεται (Callaham & Torrey, 1981; Van Spronsen *et al.*, 1994), παρατηρείται εγκόλπωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και στην περιοχή γύρω από την εγκόλπωση αρχίζει να εναποτίθεται νέο κυτταρικό

τοίχωμα (Bauer, 1981; Newcomb, 1981; Brewin, 1991; Kijne, 1992). Η εναπόθεση νέου κυτταρικού τοιχώματος καταλήγει στο σχηματισμό μιας κυλινδρικής δομής που ονομάζεται **μολυσματικό νημάτιο** μέσω της οποίας εισέρχονται τα βακτήρια στο εσωτερικό του φυτού (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μολυσματικό νημάτιο

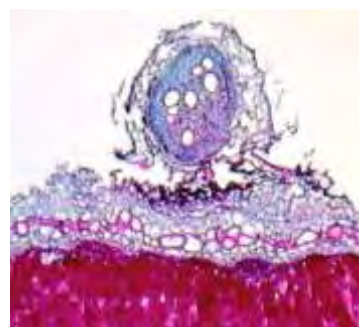
Ταυτόχρονα με το σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου, ενεργοποιείται η κυτταροδιαίρεση των κυττάρων του φλοιώδους παρεγχύματος για να



Εικόνα 6: βακτηριοειδή

σχηματιστεί το αρχέφυτρο του φυματίου. Το μολυσματικό νημάτιο μεγαλώνει με κατεύθυνση προς το αρχέφυτρο του φυματίου και μόλις φτάσει εκεί τα βακτήρια απελευθερώνονται και εισέρχονται στο φυμάτιο με μια διαδικασία που μοιάζει με ενδοκύττωση (Basset *et al.*, 1977). Εντός του φυτικού κυττάρου τα ριζόβια χάνουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και μεταπίπτουν στη συμβιωτική τους μορφή, τα **βακτηριοειδή** (Εικόνα 6).

Στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων τα βακτηριοειδή περιβάλλονται από μια μεμβράνη η οποία προέρχεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου και ονομάζεται **περιβακτηριακή μεμβράνη**. Η πρωτεϊνική σύνθεση της μεμβράνης αυτής διαφέρει από την αντίστοιχη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, γεγονός που της προσδίδει κάποιες ιδιαίτερες λειτουργίες (Verma, 1992). Η περιβακτηριακή μεμβράνη έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στο να ελέγχει την ανταλλαγή των μεταβολιτών μεταξύ φυτού και βακτηριοειδούς. Ο χώρος που δημιουργείται μεταξύ της περιβακτηριακής μεμβράνης και της μεμβράνης του βακτηριοειδούς ονομάζεται **περιβακτηριακός χώρος**. Η νεοσχηματισμένη δομή που αποτελείται από τα βακτηριοειδή μαζί με την περιβακτηριακή μεμβράνη που τα περιβάλλει, ονομάζεται **συμβιώσωμα**. Μόλις απελευθερωθούν τα βακτήρια, το αρχέφυτρο του φυματίου διαφοροποιείται σε αζωτοδεσμευτικό φυμάτιο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Φυμάτιο

## Σηματοδότηση για εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης

Στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίου-ψυχανθούς κεντρικό ρόλο έχουν σηματοδοτικά μόρια όπως οι παράγοντες Nod ή οι λιπο-χιτο-

ολιγοσακχαρίτες (Denarie *et al.*, 1996; Long, 1996; Oldroyd, 2001). Η παραγωγή τέτοιων σηματοδοτικών μορίων ενεργοποιείται από την απελευθέρωση φαινολικών ουσιών, κυρίως φλαβονοειδών, από το φυτό προς τη ριζόσφαιρα. Η παρουσία των ουσιών αυτών στη ριζόσφαιρα ενεργοποιεί την παραγωγή των Nod παραγόντων του κατάλληλου ριζοβιακού στελέχους μέσω επαγωγής των αντίστοιχων *nod* γονιδίων.

Πολύ σημαντικό στοιχείο στη σηματοδότηση των Nod παραγόντων αποτελεί το ασβέστιο (Ehrhardt *et al.*, 1996). Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι πραγματοποιούνται αλλαγές στη συγκέντρωση του ασβεστίου των ριζικών τριχιδίων οι οποίες επάγονται από τους παράγοντες Nod (Cardenas *et al.*, 2000). Παρατηρούνται δύο γεγονότα που αφορούν το ασβέστιο και διαφέρουν τοπικά και χρονικά. Το ένα είναι αυξημένη ροή ασβεστίου στην άκρη του ριζικού τριχιδίου και το άλλο είναι ταλάντευση συγκέντρωσης ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα (Oldroyd & Downie, 2004). Το ασβέστιο είναι ένας συχνός δευτερογενής αγγελιοφόρος που είναι πιθανό να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων ανταποκρινόμενος σε ένα σηματοδοτικό μόριο.

Ο υποδοχέας των Nod παραγόντων είναι πιθανότατα ένα ετεροδιμερές δύο τύπων κινασών που περιέχουν από έναν τομέα LysM στην εξωκυττάρια περιοχή (Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). Οι τομείς LysM δεσμεύουν πολυσακχαρίτες, ιδιαίτερα αλυσίδες γλυκοσαμινών, που αποτελούν το σκελετό των μορίων των Nod παραγόντων. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα αυτό αποτρέπουν όλες τις αλλαγές που επάγονται από τους παράγοντες Nod, όπως είναι οι αλλαγές στο ασβέστιο (Amor *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003).

Επόμενα στοιχεία του σηματοδοτικού μονοπατιού φαίνεται να είναι το DMI1, που είναι πιθανώς ένα κανάλι κατιόντων, και το NORK/SYMRK/DIM2, άλλη μια κινάση με πλούσιες σε λευκίνη (Leu) επαναλαμβανόμενες περιοχές στο εξωκυττάριο τμήμα (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Ane *et al.*, 2004). Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες αυτές αποτρέπουν τις αλλαγές που επάγονται από τους παράγοντες Nod, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στο ασβέστιο (Wais *et al.*, 2000; Shaw & Long, 2003). Η παρουσία κινασών εμπλέκει φωσφορυλιώσεις αρκετά νωρίς στο μονοπάτι σηματοδότησης των Nod παραγόντων, δείχνοντας ότι οι στόχοι των κινασών αυτών είναι βασικής σημασίας για τη σύνδεση της υποδοχής των Nod παραγόντων με την ενεργοποίηση των αλλαγών στο ασβέστιο.

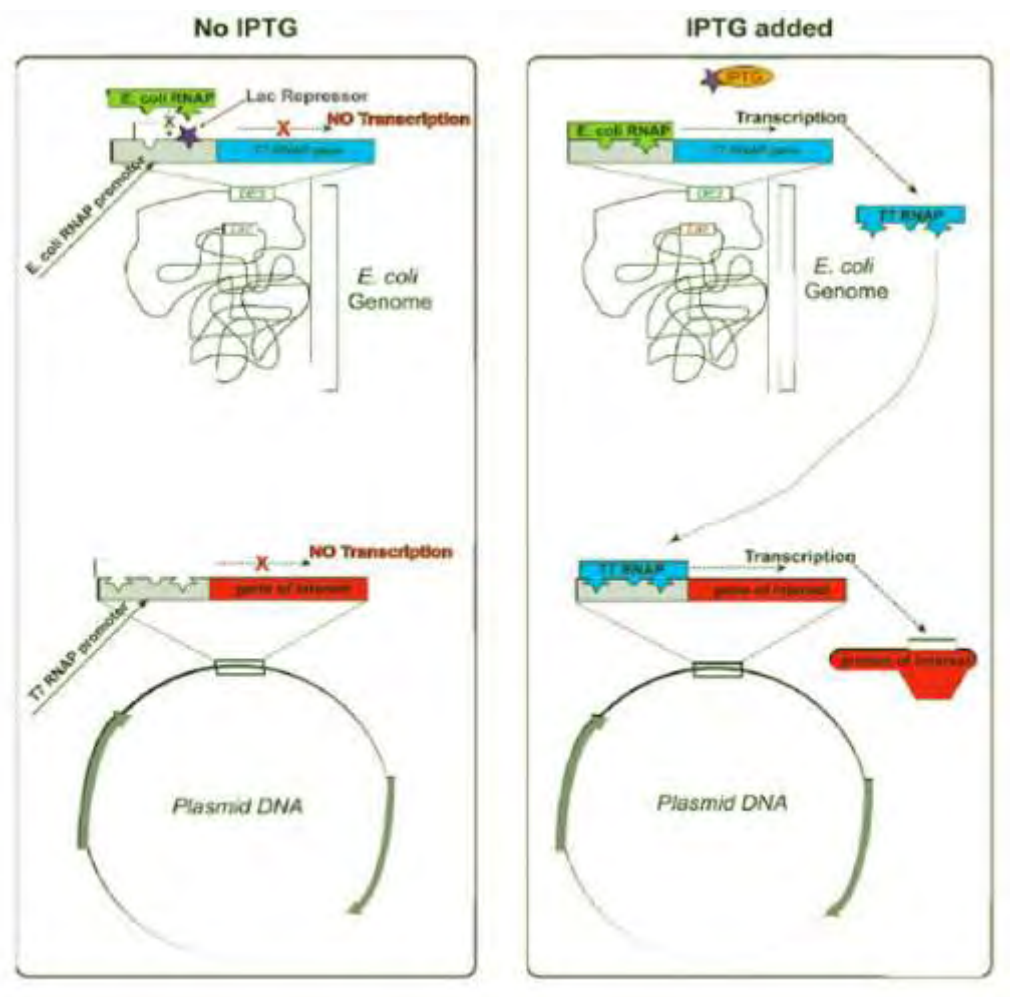
Η πρωτεΐνη DMI3 από το *M. truncatula* είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *dmi3* είναι φαινοτυπικά όμοιες με τις *dmi1* και *dmi2*, εκτός από το γεγονός ότι μπορούν να ενεργοποιηθούν οι αλλαγές στο ασβέστιο (Catoira *et al.*, 2000; Wais *et al.*, 2000). Αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση στις αλλαγές ασβεστίου προηγείται της λειτουργίας της πρωτεΐνης DMI3, οπότε είναι πολύ πιθανό η πρωτεΐνη αυτή να αποκωδικοποιεί το σήμα των αλλαγών στο ασβέστιο και στη συνέχεια να το μεταδίδει. Η

υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η DMI3 είναι μια χημική ασβέστιο/καλμοδουλίνη-εξαρτώμενη κινάση (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004a).

## Υλικά και μέθοδοι

### Βακτηριακά στελέχη

Για την εκπόνηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν DE3 στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*. Τα στελέχη αυτά φέρουν ένα αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης (πολυμεράση που έχει απομονωθεί από το βακτηριοφάγο T7), το οποίο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του καταστολέα της λακτόζης (Rosenberg *et al.*, 1987). Παρουσία IPTG, η T7 RNA πολυμεράση εκφράζεται και επιτρέπεται έτσι η παραγωγή της πρωτεΐνης που εισάγουμε στο γονιδίωμα του βακτηρίου (Εικόνα 8). Το IPTG είναι μη μεταβολίσιμος μιμητής της λακτόζης, έτσι ανταγωνίζεται τον καταστολέα λακτόζης χωρίς να παρατηρείται αποικοδόμηση του μετά από κάποιο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 8: Μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης γονιδίου από το IPTG

## Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA

---

1. Σε 100μl δεκτικών κυττάρων DE3 προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA.
2. Το μείγμα αναμιγνύεται και επώαζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Ακολουθεί θερμικό σοκ με επώαση για 2 λεπτά στους 42°C.
4. Επώαση για 1 λεπτό στον πάγο και για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, ανάμιξη του δείγματος και επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
6. Φυγοκέντρωση στις 5.000rpm για 4 λεπτά και αφαίρεση περίπου 800μl LB.
7. Επαναδιάλυση του ιζήματος.
8. Κατάλληλη ποσότητα του δείγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό. Σε περίπτωση πλασμιδιακού φορέα που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο θρεπτικό μέσο του χρωμοφόρου υποστρώματος X-gal και του παράγοντα IPTG που δρα σαν επαγωγέας του υποκινητή του lacZ γονιδίου, σε τελικές συγκεντρώσεις 5mM και 50mM αντίστοιχα.
9. Επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 12-16 ώρες.

## Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα

---

1. Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους το οποίο πρόκειται να αποθηκευτεί, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών στους 37°C για 12 ώρες.
2. 700μl από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf.
3. Προσθέτονται 300μl γλυκερόλης 99%.
4. Το μείγμα αναμιγνύεται έντονα και ψύχεται σε υγρό άζωτο.
5. Αποθήκευση στους -80°C.

## Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli*

---

A. Μέθοδος αλκαλικής λύσης με το plasmid purification kit της Macherey-Nagel.



## Υπολογισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA βασίστηκε στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προς εξέταση δειγμάτων στα 260nm και 280 nm. Η μέτρηση στα 260nm μας επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τόσο του RNA όσο και του DNA σύμφωνα με το νόμο των Beer-Lambert. Σε καθαρά δείγματα RNA, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις, ο λόγος  $O.D_{260}/O.D_{280}$  ισούται με 2. Ισχύει ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA ίση με 40μg/ml. Έτσι ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του RNA υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$[RNA]_{mg/ml} = 40_{mg/ml} \times O.D_{260} \text{ του δείγματος} \times \text{συντελεστή αραίωσης}$$

Σε καθαρά δείγματα DNA, όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις, ο λόγος  $O.D_{260}/O.D_{280}$  ισούται με 1,8. Επίσης ισχύει ότι οπτική απορρόφηση στα 260nm ίση με τη μονάδα, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA ίση με 50μg/ml. Έτσι ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης του DNA υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$[DNA]_{mg/ml} = 50_{mg/ml} \times O.D_{260} \text{ του δείγματος} \times \text{συντελεστή αραίωσης}$$

## Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA) σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος του μεγέθους των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μια χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η αναλυτική ικανότητα της πηκτής αγαρόζης είναι ανάλογη της περιεκτικότητάς της σε αγαρόζη. Η συνήθης συγκέντρωση κυμαίνεται από 0.7%-2% αγαρόζη. Για την πιστοποίηση του μεγέθους χρησιμοποιείται μάρτυρας DNA γνωστού μοριακού βάρους.

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε **1x TAE**.
- Θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διάφανο.

- Προσθήκη διαλύματος **βρωμιούχου αιθιδίου** σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την πήξη, απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται στη συσκευή κατάλληλος όγκος διαλύματος 1x TAE που αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.
- Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται κατάλληλη ποσότητα **διαλύματος φόρτωσης**.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης 50-120V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και την περιεκτικότητά της σε αгарόζη.

### Απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας από πηκτή αгарόζης

Το δείγμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 0.8-2%.

Όταν η ζώνη που πρόκειται να απομονωθεί έχει διαχωριστεί ικανοποιητικά από τις υπόλοιπες, αφαιρείται με τη χρήση κοπιδίου.

Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε η στήλη καθαρισμού και το πρωτόκολλο της εταιρίας Macherey-Nagel.

### Αντίδραση ενοποίησης τμημάτων DNA

Η αντίδραση ενοποίησης είναι μια αντίδραση κατά την οποία δίκλινα μόρια DNA, με κολλώδη (5' ή 3' εξέχοντα άκρα) ή τυφλά άκρα ενώνονται μεταξύ τους.

Ο πλασμιδιακός φορέας και το τμήμα DNA προς ενοποίηση απομονώνονται και καθαρίζονται. Η συνήθης αναλογία άκρων πλασμιδιακού φορέα προς ένθετο DNA είναι 1:3. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι συνήθως 10μl.

- Σε φιαλίδιο erppendorf τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα DNA από τον πλασμιδιακό φορέα και από το προς υποκλωνοποίηση ένθετο, σε μέγιστο τελικό όγκο 4μl.
- Προσθήκη 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης
- Προσθήκη 1μl T4 DNA λιγάσης (1 unit/μl) (Takara)
- Το δείγμα επωάζεται στους 4°C για 14-16 ώρες

Στην περίπτωση ενοποίησης κομματιών με τυφλά άκρα, στην αντίδραση ενοποίησης χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα T4 DNA λιγάσης και η συνιστώμενη θερμοκρασία επώασης είναι οι 25 °C.

Ο υπολογισμός της ποσότητας DNA που χρησιμοποιείται για την αντίδραση ενοποίησης έγινε μέσω του τύπου:

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert} \times \frac{\text{insert}}{\text{vector}} \text{ molar ratio}}{\text{kb size of vector}}$$

Τα διαλύματα και οι ποσότητες τους που χρησιμοποιήθηκαν για την ενοποίηση τμημάτων νουκλεϊκών οξέων, στο παρόν πείραμα του γονιδίου *LjGSK3β* και του πλασμιδιακού φορέα pET28a και pET21a, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

<b>Αντιδραστήρια ligation</b>	<b>(μl)</b>
Buffer 10x	2
pET28a (100ng)	6
GSK	3,5
Λιγάση Takara	1
ATP	1
H2O	6,5
Τελικός όγκος	20

### Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Σε φιαλίδιο erppendorf προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH<sub>2</sub>O, 1/10 του όγκου του κατάλληλου 10x ρυθμιστικού διαλύματος ανάλογα με το ένζυμο, 1/10 του όγκου 10x BSA (Bovine Serum Albumin) εάν απαιτείται, κατάλληλη ποσότητα DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού.

10x ρυθμιστικό διάλυμα, τελικό ποσοστό	10%
10x BSA (όπου απαιτείται)	
Δείγμα DNA	≤80%
Ένζυμο περιορισμού	≤10%
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι 100%

Ανάμειξη του δείγματος και επώαση 1-12 ώρες στους 37°C. Η άριστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού, αλλά για τα περισσότερα η άριστη θερμοκρασία είναι 37°C.

Ποιο συγκεκριμένα η πέψη των νουκλεϊκών οξέων σε αυτή την εργασία είχε την μορφή που φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

Αντιδραστήρια πέψης	GSK (μl)	pET21 (μl)
DNA	35	16
Buffer	5	5
XhoI	1	1
EcoRI	1	1
H <sub>2</sub> O	7,5	26,5
BSA	0,5	0,5
Τελικός όγκος	50	50

## Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση ακολουθιών DNA. Ο πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών του DNA γίνεται με ταυτόχρονη επέκταση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων. Τα απαραίτητα συστατικά μιας αντίδρασης PCR είναι:

- Το δίκλωνο μόριο DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε.
- Ένα ζεύγος κατάλληλων εκκινητών που υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και προσδιορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (0,1-1μM).
- Μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (20-25 units/ml),
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (200μM από το καθένα) και
- Ιόντα Mg<sup>2+</sup>

Μια τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει σε πρώτη φάση την αποδιάταξη του DNA στόχου σε υψηλή θερμοκρασία. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Στην συνέχεια αυξάνουμε την θερμοκρασία για να γίνει η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων από την πολυμεράση. Οι τρεις αυτές διαδικασίες επαναλαμβάνονται

από 20 έως 30 φορές με αποτέλεσμα η αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της κωδικής περιοχής του γονιδίου της GSK3β στο φυτό *L. japonicus* καθώς και για την δημιουργία κατάλληλων άκρων που επιτρέπουν την κλωνοποίησή τους στον φορέα έκφρασης. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκαν κλώνοι που προέρχονταν από cDNA βιβλιοθήκη μολυσμένων και μη ριζών. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η Phusion από την Finnzymes.

Η αντίδραση πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκε είχε ως εξής:

Αντιδραστήρια PCR	Πυκνό διάλυμα	όγκος	Τελική συγκέντρωση
Μήτρα DNA	-	-	10ng
Εκκινητής 1	5 μM	5μl	0,5μM
Εκκινητής 2	5 μM	5μl	0,5μM
Μείγμα dNTP's	10mM	1μl	200μM
Ρυθμιστικό διάλυμα	10X	5μl	1X
Kapa Taq	1unit/μl	0,5μl	1 unit
ddH <sub>2</sub> O	-	εώς 50μl	-

Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που ακολουθήθηκε για 35 κύκλους είχε την μορφή:

Συνθήκες ενίσχυσης	
Αρχική αποδιάταξη	94°C για 2 λεπτά
Αποδιάταξη	94°C για 30sec
Σύνδεση εκκινητή	63°C για 30sec
Επιμήκυνση	72°C για 45sec
	72°C για 10 λεπτά

Μετά από κάθε αντίδραση PCR ακολουθούσε καθαρισμός των δειγμάτων σύμφωνα με το PureLink PCR Purification kit της invitrogen.

Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας υβριδοποίησης για όλους τους εκκινητές έγινε μέσω του τύπου:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \lg M + 0,41(GC) - 500/n$$

## Δημιουργία βακτηριακής καλλιέργειας για την επαγωγή έκφρασης του γονιδίου *LjGSK3β*

---

Από τρυβλίο όπου καλλιεργούνται βακτήρια *E. coli*, τα οποία φέρουν πλασμίδιο pET28a με ενσωματωμένο το γονίδιο *LjGSK3β*, εμβολιάζονται μικρές υγρές καλλιέργειες. Οι μικρές υγρές καλλιέργειες αποτελούνται από 5ml θρεπτικού LB και 5μl αντιβιοτικού, στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούμε καναμικίνη. Ακολουθεί επώαση στους 37°C με ανάδευση στις 210rpm για 12-16 ώρες.

Το επόμενο στάδιο περιέχει την δημιουργία μεγάλων υγρών καλλιεργειών. Ακολουθήθηκαν δυο στρατηγικές:

- Μεγάλες υγρές καλλιέργειες που περιείχαν 50ml θρεπτικού υλικού LB και 50μl αντιβιοτικού, όπου εμβολιάστηκαν με 2,5ml από τις μικρές υγρές καλλιέργειες.
- Μεγάλες υγρές καλλιέργειες που περιείχαν 10ml θρεπτικού υλικού LB και 10μl αντιβιοτικού, οι οποίες εμβολιάστηκαν με 100μl από τις ,μικρές υγρές καλλιέργειες.

Σε κάθε περίπτωση μετά από τον εμβολιασμό ακολουθείται επώαση στους 37°C στις 210rpm με ενδιάμεσες φωτομετρήσεις στα 600nm μέχρι η απορρόφηση να φτάσει στα 0,5od.

Έπειτα επάγεται η έκφραση του γονιδίου *LjGSK3β* με την προσθήκη του επαγωγέα IPTG στην καλλιέργεια.

## Λύση κυττάρων *Escherichia coli*

---

Στα κύτταρα προστίθενται 5ml lysis buffer και 100μl λυσοζύμης. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά και λύση των κυττάρων με sonication, δηλαδή την χρήση υπερηχητικών συχνοτήτων για την λύση των κυττάρων. Το sonication έγινε σε ένταση 50% και ο κύκλος ορίστηκε 1.

Για την λύση των κυττάρων από τα οποία πραγματοποιήθηκε έπειτα ο καθαρισμός της πρωτεΐνης ακολουθήθηκε διαφορετικό πρωτόκολλο. Στα κύτταρα προστέθηκαν 20ml lysis buffer, 0,1% Triton και 0,5mM αναστολέα πρωτεασών (PMSF). Μετά από ανάδευση ακολουθεί sonication για 15 λεπτά σε ένταση 20% και ο κύκλος είχε οριστεί 0,5.

## Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

---

Κατά την ηλεκτροφόρηση ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής

μετακινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια κινούνται με πιο αργούς ρυθμούς. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμίδιου, με κατεύθυνση ροής από πάνω προς τα κάτω.

- Το πρωτεϊνικό μίγμα διαλύεται πρώτα σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει μεταξύ άλλων SDS και μερκαπτοαιθανόλη. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης και η μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς.
- Η πηκτή αποτελείται από δυο ζώνες που έχουν διαφορετική σύσταση. Η πρώτη αποτελείται από το stacking gel, όπου βρίσκεται στο πάνω μέρος της πηκτής και έχει το σημείο φόρτωσης των δειγμάτων. Η δεύτερη ζώνη αποτελείται από το separating gel και αποτελεί το σημείο στο οποίο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος τους.
- Το separating gel τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου, αφού στερεοποιηθεί προστίθεται το stacking gel και τοποθετούνται μια χτένα για την δημιουργία θέσεων φόρτωσης.
- Μετά την πήξη, απομακρύνεται η χτένα και προστίθεται στη συσκευή κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις της πηκτής και λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση παρουσία συνεχούς τάσης αρχικά στα 100V και όταν τα δείγματα έχουν διασχίσει το stacking gel η τάση αλλάζει στα 130V.
- Οι πρωτεΐνες εμφανίζονται με χρώση της πηκτής με κυανούν του Coomassie και αποχρωματισμό με δύο διαλύματα destain 1 και destain 2.

## Καθαρισμός της πρωτεΐνης

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με την εκμετάλλευση της ιδιότητας διαφόρων μεταλλικών ιόντων, όπως είναι το νικέλιο (Ni) και το κοβάλτιο (Co), που εμφανίζουν συγγένεια με πολύ-ιστιδινικές αλληλουχίες. Επομένως μια πρωτεΐνη μπορεί να σηματοδοτηθεί είτε στο αμινοτελικό είτε στο καρβοξυτελικό της άκρο με μια ουρά πολύ-ιστιδίνης και στην συνέχεια να καθαριστεί με την χρήση beads νικελίου. Η γενική μέθοδος είναι να συγκρατηθεί η πρωτεΐνη επί της στήλης, με ανάμιξη των σφαιριδίων νικελίου με το δείγμα και στη συνέχεια, το πηκτό αυτό εναιώρημα να μεταφερθεί σε μια στήλη, όπου επικρατούν χαμηλές συγκεντρώσεις

φωσφατασών και ιμιδαζόλιου που επιτυγχάνουν την αφαίρεση δεσμευμένων πρωτεϊνών με χαμηλή συγγένεια. Η πρωτεΐνη με την ουρά πολύ-ιστιδίνης απελευθερώνεται τελικά από τα beads νικελίου με την έκπλυση της με μεγάλη συγκέντρωση ιμιδαζόλιου.

- Όλη η ποσότητα αιθανόλης αφαιρείται από τα beads, τα οποία ξεπλένονται στην συνέχεια με 1ml buffer A (δύο φορές) και φυγοκεντρούνται στις 3.000rpm για 1 λεπτό.
- Στα beads προστίθεται το υπερκείμενο, που συλλέχθηκε μετά από την φυγοκέντρωση των λυμένων κυττάρων, και μικρή ποσότητα buffer A (<1ml).
- Το υπερκείμενο με τα beads τοποθετούνται στην ρόδα για 2 ώρες στους 4°C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3.000rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
- Τα beads ξεπλένονται δύο φορές με 15ml buffer A και έπειτα επαναδιαλύονται σε 1ml buffer A και τοποθετούνται στην κολώνα.
- Στην πρώτη πλύση προστίθενται 1.500μl Buffer A και αφήνεται να απομακρυνθεί χωρίς να ασκηθεί πίεση.
- Στη δεύτερη έκπλυση προστίθενται προσεκτικά 500μl Buffer A και 0,2% Triton.
- Στην τρίτη έκπλυση χρησιμοποιούμε 500μl Buffer A (δύο φορές)
- Η τέταρτη έκπλυση πραγματοποιείται με την προσθήκη 200μl Buffer A και DTT
- Έπειτα στην στήλη προστίθενται 200μl ιμιδαζόλιο (0,5M) και αναδεύεται στην ρόδα για 15-30 λεπτά.
- Το έκλουσμα συλλέγεται και προστίθενται σε αυτό 200μl ιμιδαζόλιο και μπορεί να διατηρηθεί έτσι για μια μέρα στους 4°C.
- Τέλος συλλέγεται το δεύτερο έκλουσμα και τα beads ξεπλένονται με H<sub>2</sub>O ή με Buffer A

## Θρεπτικά υλικά και διαλύματα

### Θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη βακτηρίων

**LB:** θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *E. coli*

0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης

1%(w/v) NaCl

1% (w/v) πεπτόνη

Στην περίπτωση στερεού υποστρώματος, προστίθεται 1,5% (w/v) άγαρ.



## **Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA**

### **Ρυθμιστικό διάλυμα 50X TAE**

- 24.2g(w/v) Tris-base
- 100ml/lit 0.5M EDTA pH 8.0
- 57.1 ml/lit CH<sub>3</sub>COOH

### **Βρωμιούχο αιθίδιο**

- 5mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O

Διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου.

### **10X Loading buffer για πηκτή DNA (10ml)**

- 0.021g μπλε της βρωμοφαινόλης
- 0.021g Xylene Cyanol
- 0,2M EDTA
- 5g γλυκερόλη.

## **Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών**

### **Laemni (χρωστική φόρτωσης)**

- 4% SDS
- 20% glycerol
- 0,1M Tris-HCl pH 6,8
- 10% β-mercaptoethanol
- bromophenol blue
- H<sub>2</sub>O

### **Ρυθμιστικό διάλυμα (5L)**

- 1,5mTris pH 8,9
- 1M Tris HCl pH 6,8

### **Stacking gel (5ml)**

- 3,4ml H<sub>2</sub>O
- 0,63ml 30% acrylamide mix
- 0,63ml 1M Tris HCl pH6,8
- 0,05ml 10% SDS
- 5μl TEMED
- 50μl APS.

### **Separating gel 12% (10ml)**

- 3,3ml H<sub>2</sub>O
- 4ml 30% acrylamide mix
- 2,5ml 1,5M Tris HCl pH8,9
- 0,1ml 10% SDS
- 10μl TEMED
- 50μl APS

#### **Destain 1**

- 30% μεθανόλη
- 10% οξικό οξύ

#### **Destain 2**

- 5% μεθανόλη
- 7% οξικό οξύ

#### **Coomassie Stain**

- 50% μεθανόλη
- 10% οξικό οξύ
- 0.05% Brilliant Blue R-250

Αρχικά το Brilliant blue διαλύεται στην μεθανόλη και μετά προστίθεται το οξικό οξύ.

### **Διαλύματα για την λύση των κυττάρων**

#### **Lysis buffer**

- 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 300mM NaCl
- 250mM ιμιδαζόλης

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με NaOH και πρέπει να είναι 8.

#### **Buffer A**

- 50mM Tris
- 100mM NaCl
- 10% γλυκερόλη

Το pH του διαλύματος αυτού ρυθμίζεται στο 7,5 με HCl ή NaOH

## Σκοπός του πειράματος

---

Οι GSK3 εμπλέκονται στην ρύθμιση πολλών φυσιολογικών διεργασιών, όπως είναι ο μεταβολισμός γλυκαγόνου, η σύνθεση πρωτεϊνών, η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, στα φυτά έχουν εντοπιστεί κινάσες της οικογένειας GSK, οι οποίες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δημιουργίας φυματίων. Αν και έχει απομονωθεί το γονίδιο που φέρει την αλληλουχία της GSK3β στα φυτά, δεν έχει επιτευχθεί ακόμα η απεικόνιση της τριτοταγής δομής της. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθεί είναι να υπερεκφραστεί το γονίδιο *LjGSK3β*, έτσι ώστε να απομονωθεί η καθαρή πρωτεΐνη σε μεγάλη ποσότητα και να ακολουθήσει ο προσδιορισμός της ακριβούς δομής της με την βοήθεια της κρυσταλλογραφίας.

## Πειραματικά αποτελέσματα

### Πλασμιδιακοί φορείς

Για τον μετασχηματισμό των κυττάρων της *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακοί φορείς, ο pET28a και ο pET21a. Σε αυτά τα πλασμίδια είναι δυνατή η ένθεση γονιδίου υπό τον έλεγχο του T7 lac υποκινητή. Αυτό το γεγονός καθιστά δυνατή την επαγόμενη έκφραση του γονιδίου αυτού. Ένα ακόμη κοινό χαρακτηριστικό αυτών των φορέων, όσον αφορά το εισαγόμενο γονίδιο και την έκφραση του, είναι το γεγονός ότι προσθέτουν μια ουρά ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η ουρά ιστιδίνης αποτελείται από έξι κατάλοιπα ιστιδίνης και είναι απαραίτητη για να πραγματοποιηθεί ο καθαρισμός της πρωτεΐνης. Η βασική διαφορά των δύο πλασμιδίων είναι ότι το πλασμίδιο pET28a περιέχει στην αλληλουχία του ένα γονίδιο που προσδίδει στο βακτήριο ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη (Kan), ενώ το πλασμίδιο pET21a φέρει το γονίδιο που καθιστά τον μικροοργανισμό ανθεκτικό στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Amp).

### Προετοιμασία βακτηριακών κυττάρων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *LjGSK3β*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στο παράρτημα.

Έπειτα ακολουθεί η πέψη του ενισχυμένου γονιδίου και του πλασμιδίου, που θα αποτελέσει τον φορέα του *LjGSK3β* στα βακτηριακά κύτταρα. Η πέψη αυτή γίνεται με δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, την *XhoI* και την *EcoRI*. Μετά από την πραγματοποίηση της πέψης αυτής, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** ηλεκτροφόρηση του γονιδίου *LjGSK3β* και του πλασμιδίου pET21, μετά από την πέψη τους με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *XhoI* και *EcoRI*.

Ακολούθησε η απομόνωση του DNA από την πηκτή αгарόζης με την χρήση στήλης καθαρισμού και το πρωτόκολλο της εταιρίας Macherey-Nagel. Αυτά τα μόρια DNA χαρακτηρίζονται πλέον από κολλώδη άκρα, τα οποία ευθύνονται για την εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα. Η αντίδραση

ενοποίησης των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε με την χρήση της T4 DNA λιγάσης (Takara).

Τέλος επιτεύχθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων rosetta με την πρόκληση θερμικού shock.

## Επαγωγή γονιδίων

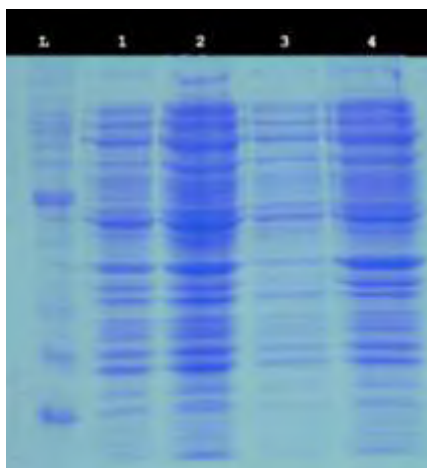
Κατά την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *LjGSK3β* έχουμε καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Σκοπός μας ήταν η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών επαγωγής έτσι ώστε να είναι δυνατή η απομόνωση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης GSK. Σε κάθε επαγωγή, μεταβλητές συνθήκες αποτελούσαν η συγκέντρωση του επαγωγέα IPTG, η θερμοκρασία επαγωγής και ο χρόνος που είχαν τα κύτταρα να αναπτυχθούν κάτω από αυτές τις συνθήκες.

- Μεγάλες υγρές καλλιέργειες των 50ml

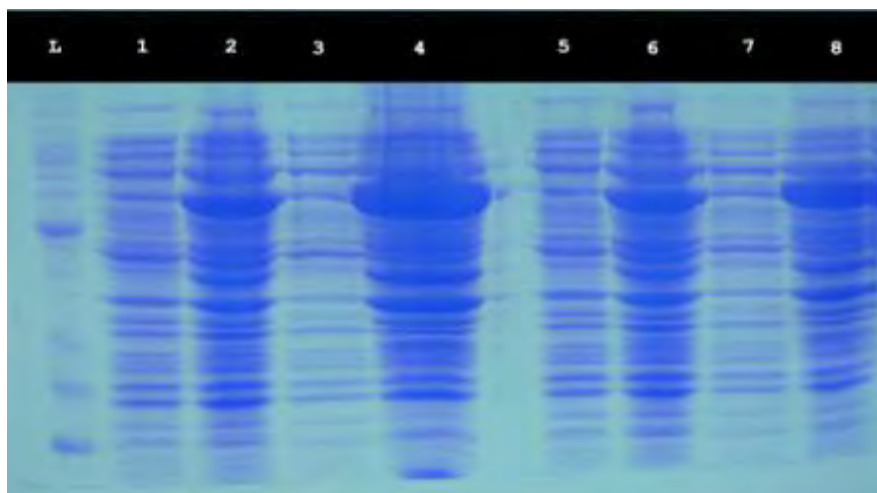
Οι μεγάλες υγρές καλλιέργειες αποτελούνται από 50ml θρεπτικού υλικού LB, το οποίο έχει εμβολιαστεί με 2,5ml μικρής υγρής καλλιέργειας μετασχηματισμένων, με το πλασμίδιο pET28a, κυττάρων rosetta. Οι συνθήκες επαγωγής επιλέχθηκαν να είναι οι παρακάτω

- 0,5mM IPTG στους 18°C για 3 ώρες
- 0,4mM IPTG στους 37°C για 1 ώρα
- 0,4mM IPTG στους 26°C για 2 ώρες

Μετά από την επαγωγή στα κύτταρα προστίθεται το lysis buffer και επωάζονται για 30 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί η λύση των κυττάρων με sonication (έξι φορές για 10sec) και φυγοκέντρωση τους στις 10.000rpm για 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο φυλάσσεται σε μια φιάλη erppendorf και το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα ουρίας (8M) αναδεύεται overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων, τα δείγματα που συλλέχθηκαν ηλεκτροφορούνται σε πηκτή SDS (Εικόνα 10 και Εικόνα 11).



**Εικόνα 10:** πηκτή SDS ηλεκτροφόρησης, όπου (L) είναι ο ladder, τα δείγματα προέρχονται από την καλλιέργεια που η επαγωγή έγινε στους 18°C για 3 ώρες με 0,5mM IPTG. (1) δείγμα πριν την επαγωγή, (2) δείγμα μετά από την επαγωγή, (3) υπερκείμενο μετά από την λύση των κυττάρων, (4) ίζημα μετά από την λύση των κυττάρων



**Εικόνα 11:** πηκτή SDS ηλεκτροφόρησης όπου (L) συμβολίζει τον ladder, τα δείγματα 1-4 είναι αυτά που επάχθηκαν στους 37°C για 1 ώρα με 0,4mM IPTG, ενώ τα δείγματα 5-8 επάχθηκαν στους 26°C για 2 ώρες και συγκέντρωση IPTG ίση με 0,4mM. Τα δείγματα **1 και 5** προέρχονται πριν από την επαγωγή, τα δείγματα **2 και 6** συλλέχθηκαν μετά από την επαγωγή, τα δείγματα **3 και 7** περιέχουν το υπερκείμενο που προήλθε μετά από την λύση των κυττάρων και τέλος τα δείγματα **4 και 8** αποτελούν το διαλυμένο με ουρία ίζημα μετά από την λύση των κυττάρων.

Άλλες συνθήκες επαγωγής που μελετήθηκαν σε μεγάλες υγρές καλλιέργειες 50ml με την τήρηση του παραπάνω πρωτοκόλλου είναι οι εξής:

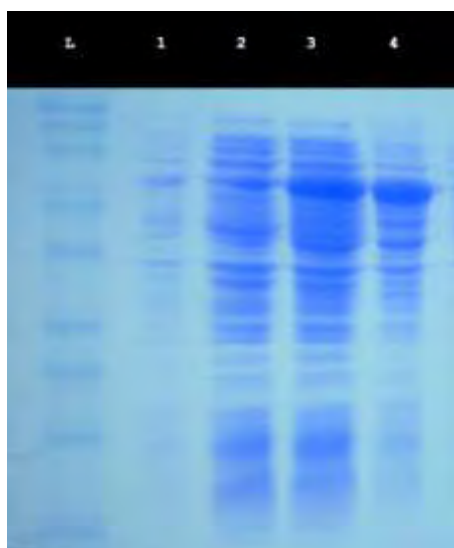
- Χωρίς την προσθήκη IPTG στους 37°C
- 1mM IPTG στους 18°C για 3 ώρες
- 0,2mM IPTG στους 18°C για 4 ώρες
- 0,2mM IPTG στους 37°C για 20 λεπτά
- 0,2mM IPTG στους 37°C για 1 ώρα
- 0,2mM IPTG στους 26°C για 2 ώρες

- Μεγάλες υγρές καλλιέργειες 10ml

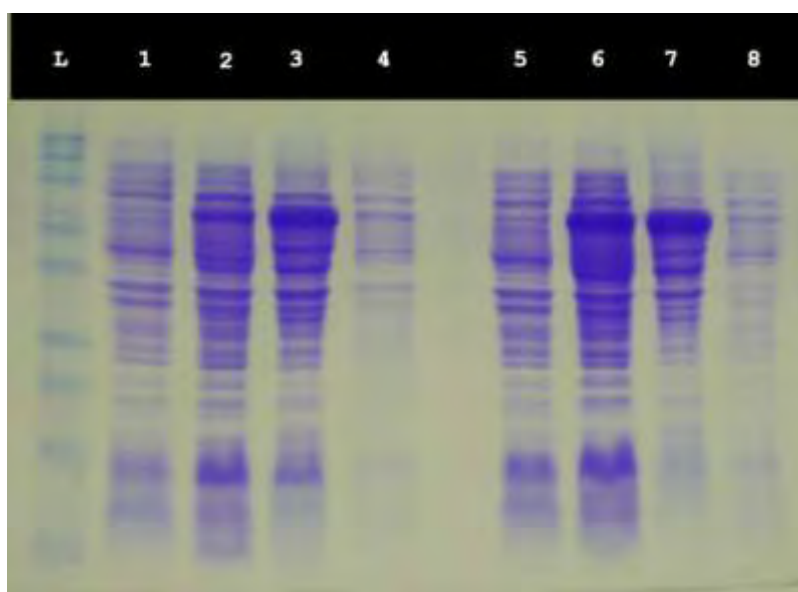
Οι μεγάλες καλλιέργειες αποτελούνται από 10ml θρεπτικού υλικού LB, το οποίο έχει εμβολιαστεί με 200μl μικρής υγρής καλλιέργειας μετασχηματισμένων κυττάρων BL21, όπου έχει εντεθεί πλασμίδιο pET21a. Οι συνθήκες επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου *LjGSK3β* ορίστηκαν όπως φαίνεται παρακάτω.

- 0,2mM IPTG στους 26°C για 4 ώρες
- 0,4mM IPTG στους 26°C για 4 ώρες
- 0,2mM IPTG στους 18°C overnight

Όταν τελειώσει η επαγωγή, φυγοκεντρούμε τα δείγματα για να συλλέξουμε τα κύτταρα και προσθέτουμε σε αυτά 500μl buffer A, 0,1% Triton και 10μl PMSF που αναστέλλει την δράση των πρωτεασών. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με sonication (δύο φορές για 30sec) και τα δείγματα τοποθετούνται στη ρόδα για 10 λεπτά στους 4°C. Για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων, τα δείγματα που συλλέχτηκαν ηλεκτροφορούνται σε πηκτή SDS (Εικόνα 12 και Εικόνα 13).



**Εικόνα 12:** πηκτή SDS ηλεκτροφόρησης όπου (L) είναι ο ladder. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από την καλλιέργεια που η επαγωγή έγινε στους 26°C για 4 ώρες με 0,4mM IPTG. (1) δείγμα πριν την επαγωγή, (2) δείγμα μετά από την επαγωγή, (3) ίζημα μετά από την λύση των κυττάρων (4) υπερκείμενο μετά από την λύση των κυττάρων



**Εικόνα 13:** πηκτή SDS ηλεκτροφόρησης όπου (L) συμβολίζει τον ladder, τα δείγματα 1-4 είναι αυτά που επάχθηκαν στους 18°C overnight με 0,2mM IPTG, ενώ τα δείγματα 5-8 επάχθηκαν στους 26°C για 4 ώρες και συγκέντρωση IPTG ίση με 0,2mM. Τα δείγματα **1 και 5** προέρχονται πριν από την επαγωγή, τα δείγματα **2 και 6** συλλέχθηκαν μετά από την επαγωγή, τα δείγματα **3 και 7** αποτελούν το διαλυμένο σε H<sub>2</sub>O ίζημα μετά από την λύση των κυττάρων και τέλος τα δείγματα **4 και 8** περιέχουν το υπερκείμενο που προήλθε μετά από την λύση των κυττάρων.

Περεταίρω δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε μεγάλες υγρές καλλιέργειες 10ml σύμφωνα με την πειραματική μέθοδο που περιγράφηκε, υπό τις εξής συνθήκες:

- Χωρίς προσθήκη IPTG στους 37°C για 4 ώρες
- 0,1mM IPTG στους 37°C για 4 ώρες
- 0,1mM IPTG στους 26°C για 4 ώρες
- 0,2mM IPTG στους 37°C για 2 ώρες
- 0,2mM IPTG στους 37°C για 4 ώρες
- 0,2mM IPTG στους 26°C για 4 ώρες
- 0,4mM IPTG στους 37°C για 4 ώρες

## Επαγωγή του γονιδίου και καθαρισμός της πρωτεΐνης

---

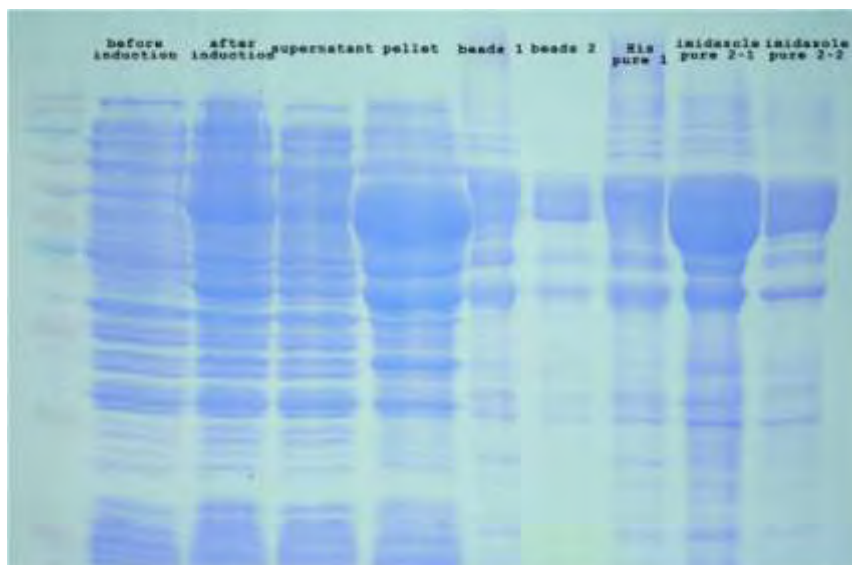
Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τις επαγωγές που πραγματοποιήθηκαν, επιλέχθηκε η βέλτιστη συνθήκη για να προβούμε στο επόμενο στάδιο του πειράματος που είναι η έκφραση της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα.

Μεγάλες υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό LB kan (300ml LB και 300μl καναμυκίνη), εμβολιάζονται με 6ml από την μικρή υγρή καλλιέργεια όπου αναπτύσσονται κύτταρα rosetta. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων αυτών πραγματοποιήθηκε με το πλασμίδιο pET28a. Οι καλλιέργειες αυτές επωάζονται στους 37°C με ανάδευση 210rpm, μέχρι η οπτική τους απορρόφηση να φτάσει τα 0,5od. Η επαγωγή θα γίνει στους 28°C για 4 ώρες, με την συγκέντρωση του IPTG να είναι 1mM. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 8.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Σε αυτό το στάδιο είναι δυνατή η αποθήκευση της κυτταρικής μάζας στους -20°C ή στους -80°C.

Για την λύση των κυττάρων η κυτταρική μάζα, που συλλέχθηκε μετά από την φυγοκέντρωση, διαλύεται σε 40ml lysis buffer, 0,1% Triton και 0,5mM αναστολέα πρωτεασών (PMSF). Μετά από ανάδευση ακολουθεί sonication δύο φορές για 15 λεπτά.

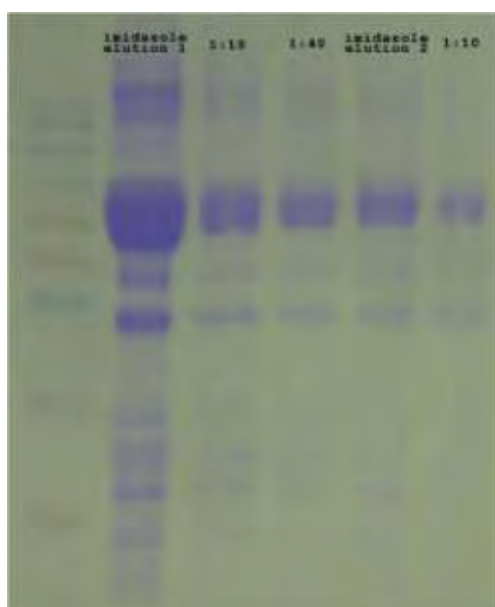
Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης θα πραγματοποιηθεί με την χρήση beads νικελίου. Χρησιμοποιήσαμε δυο διαφορετικά beads. Μετά από τον καθαρισμό της πρωτεΐνης δεν λάβαμε καθαρό δείγμα από τα beads 2, οπότε πραγματοποιήθηκε περεταίρω επώαση με ιμιδαζόλιο για 1 ώρα (δείγμα imidazole pure 2-1) και άλλη μια επώαση των ίδιων beads πάλι με ιμιδαζόλιο, overnight (δείγμα imidazole pure 2-2). Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται στην πηκτική SDS ηλεκτροφόρησης της Εικόνας 14.





**Εικόνα 14:** Πηκτή SDS ηλεκτροφόρησης όπου φαίνεται η ποσότητα της πρωτεΐνης GSK που μελετάμε. στα διάφορα στάδια της πειραματικής διεργασίας. Από τα αριστερά προς τα δεξιά βλέπουμε την ποσότητα της GSK πριν την επαγωγή, μετά την επαγωγή (1mM IPTG στους 28oC για 4 ώρες), στο υπερκείμενο και στο pellet μετά από την λύση των κυττάρων, όταν έχουν αναμιχθεί με τα beads (beads 1 και 2), μετά από την απομάκρυνση των beads (His pure 1, imidazole pure 2-1, imidazole pure 2-2).

Ακολούθησε η παρασκευή διαφόρων αραιώσεων στα δείγματα καθαρισμένης πρωτεΐνης με σκοπό την καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με τις διαδοχικές αραιώσεις επιτυγχάνουμε την απαλοιφή ζωνών ηλεκτροφόρησης που δεν μας ενδιαφέρουν και έτσι λαμβάνουμε μια εικόνα που περιέχει κυρίως την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει και σε μικρό ποσοστό την πρόσμιξη άλλων άγνωστων πρωτεϊνών (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15:** Πηκτή SDS ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα που συλλέχτηκαν μετά από την έκπλυση των beads με ιμιδαζόλιο και έχουν υποστεί αραιώσεις.

## Συζήτηση

---

Η GSK-3 έχει διατηρήσει το όνομα της για ιστορικούς λόγους, αφού πιστεύονταν ότι είναι ένα μεταβολικό ένζυμο που εντοπίζεται στα ζώα. Παρόλα αυτά αποκαλύφθηκε ότι η GSK-3 αποτελεί μια εκπληκτική πρωτεϊνική κινάση, που δεν ρυθμίζει απλά τον μεταβολισμό του γλυκογόνου, αλλά εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες και ομόλογες σε αυτήν πρωτεΐνες είναι δυνατόν να βρεθούν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Οι κινάσες της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3/SHAGGY κινάση) μελετώνται εδώ και 30 περίπου χρόνια στους ζωικούς οργανισμούς και έχει βρεθεί ότι κατέχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων αλλά και στην απόπτωση (Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR, 2011). Ακόμη είναι σημαντική η εμπλοκή της σε διάφορους τύπους καρκίνου (βλ. GSK3b στα θηλαστικά σελ. 7-8).

Στα φυτά η μελέτη των GSK έχει ξεκινήσει την τελευταία δεκαετία και έχει φανεί ότι εμπλέκονται σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες όπως είναι η απάντηση του φυτού σε μια κατάσταση στρες (Jonak *et al.*, 2000), η ανάπτυξη (Dornelas, M.C. *et al.*, 2000, Dornelas, M.C. *et al.*, 1999) και η σηματοδότηση μέσω ορμονών (Wilfried Rozhon *et al.*, 2010).

Σήμερα οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στο να διευκρινιστεί ακριβώς ο ρόλος των GSK κινασών σε δικά τους μονοπάτια σηματοδότησης, ή την πιθανή επίδραση τους σε άλλα. Η παρούσα εργασία αποτέλεσε μια προσπάθεια για την απομόνωση και τον καθαρισμό μιας GSK του φυτού *Lotus japonicus*, μέσω της εισαγωγής και έκφρασης του γονιδίου *LjGSK3β* σε βακτηριακά κύτταρα. Ο στόχος αυτής της απομόνωσης ήταν η χρήση της GSK3β του *L. japonicus* για την πραγματοποίηση περεταίρω πειραματικών διεργασιών για την διαλεύκανση του ρόλου της στο συγκεκριμένο φυτό.

Γνωρίζοντας την αλληλουχία της κινάσης ASKθ στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, βρέθηκε με την βοήθεια του BLAST το ομόλογο γονίδιο του *Lotus japonicus*. Η αλληλουχία η οποία βρέθηκε (παρατίθεται στο παράρτημα, αλληλουχία *LjGSK3β*) δεν έχει χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής, και έτσι αποφασίστηκε να μελετηθεί περεταίρω.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού αρχικά πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου του *L. japonicus* με PCR και στην συνέχεια η ενισχυμένη αλληλουχία εντέθηκε σε ειδικούς πλασμιδιακούς φορείς, με τους οποίους μετασχηματίστηκαν βακτηριακά κύτταρα *E. coli*. Μέσω αυτής της διαδικασίας παράχθηκε η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *LjGSK3β*, η οποία στη συνέχεια απομονώθηκε και καθαρίστηκε. Η καθαρή αυτή μορφή της πρωτεΐνης θα χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή δύο πειραματικών διεργασιών, έτσι ώστε να χαρακτηριστεί ο πιθανός ρόλος της στην εγκαθίδρυση συμβιωτικής σχέσης του φυτού με ριζόβιους μικροοργανισμούς καθώς και η πιθανή εμπλοκή της λουπεόλης στην διαδικασία φωσφορυλίωσης της.

Για την εξακρίβωση της πιθανής δράσης της μελετώμενης κινάσης στην συμβίωση του *L. japonicus* με ριζόβιους μικροοργανισμούς, όπως είναι το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*, δημιουργήθηκαν γενετικά τροποποιημένα φυτά *L. japonicus*, στα οποία έχει σιγαθεί το γονίδιο *LjGSK3β*. Έτσι, μολύνοντας τα τροποποιημένα φυτά με το ριζόβιο βακτήριο, μας δίνεται η δυνατότητα να παρατηρήσουμε την διακύμανση της έκφρασης της *LjGSK3β* κινάσης, παρουσία και απουσία του ριζόβιου βακτηρίου καθώς και την επίπτωση της διακύμανσης αυτής στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης.

Η δεύτερη πειραματική διαδικασία έχει ως σκοπό να εντοπιστούν πιθανές αλληλεπιδράσεις της *LjGSK3β* με την λουπεόλη. Η λουπεόλη αποτελεί ένα σημαντικό τερπένιο που φαίνεται ότι εμπλέκεται στην διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αναστέλλοντας την. Ποιο συγκεκριμένα σε κύτταρα του καρκίνου του προστάτη η λουπεόλη μεταξύ άλλων δράσεων που οδηγούν στην καταπολέμηση του καρκίνου, φαίνεται να παρεμποδίζει την *GSK3β* (Mohammad Saleem *et al.*, 2009). Για να παρατηρήσουμε αν η λουπεόλη αλληλεπιδρά με την κινάση που μας ενδιαφέρει, θα πραγματοποιηθούν μελέτες φωσφορυλίωσης της *LjGSK3β* *in vitro*, με την χρήση της κινάσης *LjGSK3β* που καθαρίστηκε με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω παρουσία καθαρής λουπεόλης.

Τα πειράματα αυτά βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη και έτσι δεν έχουν καταγραφεί ακόμα κάποια αποτελέσματα που θα διαλευκάνουν τον ρόλο της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά είμαστε ένα βήμα πιο κοντά στην απόκτηση πολύτιμης γνώσης για τις λειτουργίες μια τόσο σημαντικής πρωτεΐνης.

## Παράρτημα

---

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *LjGSK3β* ήταν οι εξής:

Forward: 5' - ACGGAATTCATGAACATGATGAGACGG-3'

Reverse: 5' - AGCTCTCGAGACTCCTTGCATGCTCAGG- 3'

Η αλληλουχία του γονιδίου *LjGSK3β*:

ATGAACATGATGAGACGGCTCAAGAGCATTGCTTCTGGGAGGACTTCTATTTCTCTCA  
GATCCTGGAGGAGATTCAAACAGCAAAAGAGCTAAGCTTGACCAAGAACTGAAAAG  
AAGGTCAATGAGGAAACAAAACTTTAGGTGGCAAAGATCAGGAGCAGCATGTGGAT  
GCATCAAAAGAATCAACTGTTGGTACATCAGATGTGTCTACAGTAGCTAAAACCTGAG  
AAGTCTGGTTTTGATGAACTTCCAAAAGAGTTACATGAAATGAAAATCAAAGATGAG  
AAAAGCAAAAACAACAATGAAAAGGATATAGAAGCAAGTATAGTGAGTGGAATGG  
AACAGAAACAGGTCAAATAATTACAACCTGCTATTGGTGGTCGAGACGGACAGCCGAA  
GCAGACAATCTCCTACATGGCTGAACGTGTGGTTGGGACTGGATCCTTTGGTGTTGT  
TTTTTCAGGCTAAGTGCCTTGAACTGGTGAAGCAGTTGCCATAAAGAAGGTGCTGCA  
AGACAAGAGATACAAGAATAGGGAACCTCCAGGTATGCGCACAGTTGACCATCCTAA  
CATTGTTAAACTAAAGCACTGTTTTCTTTTCAACTACCGATAAAGATGAGTTGTACCT  
TAACCTAGTTTTTGGAGTTTTGTTCCCGAACTGTCTACAAAGTTTTCAAAGCAATATAT  
TAGGGTGCACCAACATATGCCTATCATTTACGTGCAACTGTATATATACCAGATATG  
TCGTGCATTGAATTATTTACATCAAGTGATTGGCGTCTGTCATCGTGACATCAAACC  
TCAGAACCTATTGGTTAATCCCCAGACACATCAGTTAAAGATATGTGATTTTGGGAG  
TGCAAAGATGTTGGTGCCTGGTGAACCAACATATCATACATATGCTCTCGATACTA  
CCGAGCACCCGAGCTTATATTTGGAGCAACTGAATACACAACCTGCTATCGATATGTG  
GTCTGTTGGTTGTGTTTTGGCTGAGCTCCTTCTTGGACATCCATTGTTTCTTGGAGAG  
AGTGGAGTTGATCAGTTAGTGGAGATCATTAAGGTCTTGGGAACACCAACCAGAGAA  
GAAATCAGGTGCATGAATCCACACTACAACGAATTTAAGTTCCCTCAGATTAAAGCG  
CACCCGTGGCACAAGGTTTTTTACAAGAGGATGCCACCTGAGGCCGTGGATCTTGTG  
TCAAGGCTTCTTCAATATTCACCAAATCTACGTTGCACGGCGTTGGCTGCATGTGCAC  
ACCATTTCTTCAACGATCTACGAGACCCGAATGCATCTTTGCCAAACGGGCAACCACT  
ACCTCCTCTGTTCAATTTACACCTGAAGAAGTGGCACATGCACCTGATGAGTTGCGT  
CTACGTCTAATTCCTGAGCATGCAAGGAGTTGA

Η αλληλουχία του γονιδίου της ASK theta (*Arabidopsis SHAGGY-like protein kinases*):

ATGAACGTGATGCGTCGTCTCAAGAGCATTGCTTCGGGTCTGGACCTCCATTTCTTTCGG  
ATCCTGGTGGGGACTATGCGTTGAAGAGAGCTAAGCTGGATCAAGAGAACGACAACT  
TGTGTGTTGATCCAATGCAGGTTGACCAAAATAGTTCTTGTTTTGAGATGAAAGCTG  
ACGTTTTTGTCAACAAGAAAGTGTTGCTGGAACGTCAAATGTGCCTGCTGTATCGGAAA  
AACCCGTGGATGATCAGCTTCCCGATGTTATGATCGAAATGAAGATTAGAGACGAGC

GAAATGCCAACCGCGAGGATAAGGATATGGAAACAACGTGTTGTAAACGGCAGTGGGA  
CCGAAACGGGACAAGTTATTACGACGACAGTTGGGGGTAGAGATGGAAAGCCAAAGC  
AGACTATCTCATACATGGCCCAGCGAGTGGTTGGAACCGGCTCATTCGGAGTAGTGT  
TCCAGGCCAAGTGCCTGGAAACGGGTGAACAAGTTGCAATTAAGAAGGTTCTGCAGG  
ATAAAAGATACAAGAACAGAGAACTTCAGATCATGCGTTTGCAAGACCATCCCAACG  
TTGTGCGGCTGAGGCATTCTTTCTTTTCAACAACGTGACAAGGATGAGCTGTATCTCA  
ACCTTGTCCTTGAGTATGTTCCCGAACTGTATACAGAGCATCGAAGCACTATACCA  
AAATGAATCAGCATATGCCAATTATCTTTGTTTCAGCTCTATACTTATCAGATTTGCC  
GTGCGCTGAACTACTTACATCGCGTGGTTGGGGTGTGTCACCGTGACATTAAGCCAC  
AAAATCTACTGGTTAATCCCCAACTCATCAATTAATAATATGCGATTTTGGAAGCG  
CAAAGATGTTGGTACCCGGTGAACCTAACATATCCTATATATGCTCCCGGTACTACA  
GGGCCCCAGAACTTATATTTGGGGCGACAGAGTATACCAATGCCATTGACATGTGGT  
CCGGCGGTTGTGTCATGGCAGAGCTTTTACTTGGTCAACCACTGTTTCCCGGGGAAAG  
TGGCATTGATCAGCTGGTGGAGATAATCAAGATTCTTGGGACGCCTACAAGAGAAGA  
AATACGGTGTATGAATCCGAATTACACAGAGTTCAAGTTTCCTCAAATCAAAGCTCA  
CCCGTGGCACAAGATTTTCCACAAGCGAATGCCACCTGAAGCAGTAGACCTCGTCTCA  
AGACTCCTTCAGTACTCACCAAACCTTCGTTGCACTGCATTGGAAGCTTGTGCACACC  
CCTTCTTTGATGACTTACGGGATCCAAATGTTTCACTGCCAAATGGAAGAGCACTGCC  
TCCATTGTTTAACTTCACTGCCCCAAGAACTTGCGGGTGCATCAACAGAGCTGCGACAG  
CGTCTAATTCCAGCACATTGCCAGGGAACGGGAAGTAGCTCTTAG

- Allen N.S., Bennett M.N., Cox D.N., Shipley A., Ehrhardt D.W. and S.R. Long** (1994) Effects of Nod factors on alfalfa root hair  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^{+}$  currents and on cytoskeleton behavior. *Advances in Mol. Gen. of Plant-Microbe Interaction* **3**:107-114
- Amor B.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E., Maillet F., Penmetsa R.V., Cook D., Long S.R., Denarie J. and C. Gough** (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* **34**: 495–506
- Ane J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R.V., Oldroyd G.E., Ayax C., Levy J., Debelle F., Baek J.M., Kalo P., et al.,** (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**:1364–1367
- Basset B., Goodman R.N. and A. Novacky** (1977) Ultrastructure of soybean nodules: Release of rhizobia from the infection thread. *Can. J. Microbiol.* **23**:573-582
- Bauer W.D.** (1981) Infection of legumes by rhizobia. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**:407-449
- Bijur G.N., Jope R.S.** (2003) Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*, **14**,2415-2419
- Bilim V., Ougolkov A., Yuuki K., et al.,** (2009) Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. *Br J Cancer*, **101**:2005–14
- Brewin N.J.** (1991) Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:191-226
- Callaham D.A. and J.G. Torrey** (1981) The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**:1647-1664
- Cao Q, Feng YJ.** (2006) Glycogen synthase kinase-3b (GSK-3b) promotes proliferation of ovarian cancer cells in vitro. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, **28**:804–9
- Cardenas L., Holdawa-Clarke T.L., Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G. and P.K. Hepler** (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *-Plant Physiol* **123**: 443–451
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R.V., Journet E., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C. and J. Denarie** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**: 1647–1665
- Claisse, G., Charrier, B. and Kreis, M.** (2007) The *Arabidopsis thaliana* GSK3/Shaggy like kinase AtSK3-2 modulates floral cell expansion. *Plant Mol. Biol.* **64**, 113–124
- Clouse, S.D., and Sasse, J.M.** (1998) Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49** 427–451
- Denarie J., Debelle F. and J.C. Prome** (1996) *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**: 503–535

- Dornelas, M.C. et al.** (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Mol. Biol.* 39, 137–147
- Dornelas, M.C. et al.** (2000) *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *Plant J.* 21, 419–429
- Doyle J.J.** (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci* 3: 473–478
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M. and S.R. Long** (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256:998-1000
- Ehrhardt D.W., Wais R. and S.R. Long** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85: 673–681
- Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kalo P. and G.B. Kiss** (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962–966
- Ferguson, Brett J., Ross, John J. and Reid, James B.** (2005) Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology*, 138 4: 2396-2405
- Frame, S., and Cohen, P.** (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359, 1–16
- Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H.P., van Kammen A. and T. Bisseling** (1994) Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant physiol.* 105:787-797
- Jonak, C. et al.** (2000) Wound-induced expression and activation of WIG, a novel glycogen synthase kinase 3. *Plant Cell* 12, 1467–1476
- Jonak C., Hirt H.** (2002) Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinases in plants: an emerging family with novel functions. *Trends Plant Sci* 7: 457–461
- Kaidanovich-Beilin O., Woodgett J.R.** (2011) GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Front Mol Neurosci* 4:40
- Kameshita I., et al.** (2005) Expression Cloning of a Variety of Novel Protein Kinases in *Lotus japonicus*. *J. Biochem.* 137, 33–39
- Kijne J.W.** (1992) The *Rhizobium* infection process. *Biological Nitrogen Fixation* pp. 349-398
- Levy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ane J.M., Lauber E., Bisseling T., et al** (2004) A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361–1364
- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T and R. Geurts** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630– 633
- Long S.R.** (1996) *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8: 1885–1898

**Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., et al.**, (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637–640

**Mamaghani S., Patel S., Hedley D.W.**, (2009) Glycogen synthase kinase-3 inhibition disrupts nuclear factor- $\kappa$ B activity in pancreatic cancer, but fails to sensitize to gemcitabine chemotherapy. *BMC Cancer*, 9:132

**Mitra R.M., Gleason C.A., Edwards A., Hadfield J., Downie J.A., Oldroyd G.E. and S.R. Long** (2004a) A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4701–4705

**Miyashita K., Kawakami K., Nakada M., et al.**, (2009) Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3b inhibition against human glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 15:887–97

**Mohammad Saleem, Imtiyaz Murtaza, et al.**, (2009) Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting b-catenin signaling. *Carcinogenesis* vol.30 no.5 pp.808–817

**Naito S., Bilim V., Yuuki K., et al.**, (2010) Glycogen synthase kinase-3b: a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 16:5124–32

**Newcomb W.** (1981) Nodule morphogenesis and differentiation. In *Biology of the Rhizobiaceae*. pp. 247–297

**Oldroyd G.E.D.** (2001) Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. *Ann Bot (Lond)* 87: 709–718

**Oldroyd G.E. and J.A. Downie** (2004) Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 566–576

**Ougolkov A.V., Fernandez-Zapico M.E., Bilim V.N., et al.**, (2006) Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3b in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clin Cancer Res*, 12: 5074–81

**Pawlowski K. and T. Bisseling** (1996) Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell* 8: 1899–1913

**Pirozynski K.A. and D.W. Malloch** (1975) The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153–164

**Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., et al.**, (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585–592

**Remy W., Taylor T.N., Hass H. and H. Kerp** (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11841–11843

**Richard O., Paquet N., Haudecoeur E., Charrier B.** (2005) Organization and expression of the GSK3/shaggy kinase gene family in the moss *Physcomitrella patens* suggest early gene multiplication in land plants and an ancestral response to osmotic stress. *J Mol Evol* 61: 99–113



**Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J.J., and Studier, F.W.** (1987) *Gene*, 125-135

**R. Siobhan Darrington, Victor M. Campa, Marjorie M. Walker, et al.,** (2012) Distinct expression and activity of GSK-3a and GSK-3b in prostate cancer. *Int. J. Cancer*: 131, E872–E883

**Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, et al.,** (2005) Deregulated GSK3b activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 334:1365–73

**Shaw S.L. and S.R. Long** (2003) Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* 131:976–984

**Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K. and M. Parniske** (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959–962

**Udvardi M.K. and D.A. Day** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:493–523

**Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., van Brussel A.A.N. and J.W. Kijne** (1994) Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* 64:88-94

**Verma D.P.S** (1992) Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* 4:373-382 vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11841–11843

**Wais R.J., Galera C., Oldroyd G., Catoira R., Penmetza R.V., Cook D., Gough C., Denarie J. and S.R. Long** (2000) Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13407–1341

**Wilfried Rozhon, Juliane Mayerhofer, et al.,** (2010) ASKh, a group-III Arabidopsis GSK3, functions in the brassinosteroid signalling pathway. *The Plant Journal* 62, 215–223

**Yoo M.J., Albert V.A., Soltis P.S., Soltis D.E.** (2006) Phylogenetic diversification of glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinase genes in plants. *BMC Plant Biol* 6: 3

**Zhou Y., Uddin S., Zimmerman T., et al.,** (2008) Growth control of multiple myeloma cells through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Leuk Lymphoma*, 49:1945–53